

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Infeção Pós-Natal a Citomegalovírus – A Propósito de 2 Casos Clínicos

José Pedro Godinho Carvalho

JULHO'2019



TRABALHO FINAL MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Infeção Pós-Natal a Citomegalovírus – A Propósito de 2 Casos Clínicos

José Pedro Godinho Carvalho

Orientado por:

Inês Pires do Carmo Passão Girbal

JULHO'2019

Resumo

A infecção a Citomegalovírus (CMV) é globalmente muito prevalente no mundo. No caso dos recém-nascidos, o vírus pode ser transmitido no período pós-natal, principalmente através do leite materno, mas também da transfusão de produtos sanguíneos ou por contacto direto, nomeadamente no contexto de cuidados de saúde. Embora nos recém-nascidos de termo constitua geralmente uma infecção assintomática ou auto-limitada, também se pode manifestar como doença grave nos recém-nascidos prematuros, com sintomas *sepsis-like*, hepatite, ou pneumonite, e alterações laboratoriais como trombocitopénia, colestase e subida da PCR. O diagnóstico pode ser feito através de *Real Time Polimerase Chain Reaction* (rtPCR) de uma amostra de urina, saliva ou sangue, após exclusão de infecção congénita. Não está preconizada a instituição de terapêutica antiviral na maioria dos casos, por se tratar habitualmente de uma infecção autolimitada. Contudo, em alguns casos selecionados em que se verifique doença grave, o uso de ganciclovir tem vindo a ser relatado, embora mais estudos sejam necessários para determinar a sua eficácia e segurança nestes casos. Apesar de não estar associada a surdez neurosensorial ou alterações importantes no neurodesenvolvimento, estudos indicam que crianças que foram alvo desta infecção apresentam piores *scores* cognitivos e motores comparativamente a crianças não infetadas, embora dentro dos parâmetros da normalidade. Deste modo, a prevenção da transmissão do CMV através do tratamento do leite materno assume um papel de grande relevância. São reportados dois casos de recém-nascidos prematuros que foram expostos ao CMV no período pós-natal, apresentando manifestações como trombocitopénia, hepatoesplenomegália e colestase, mas com gravidades diferentes, influenciando a abordagem clínica.

Palavras-chave:

Citomegalovírus, leite materno, prematuridade, terapêutica antiviral, prevenção

Abstract

Citomegalovirus (CMV) infection is extremely common worldwide. In newborns, the virus can be transmitted postnatally through breast milk, blood transfusion or through direct contact, namely transmitted by healthcare professionals. Despite being mostly asymptomatic and self-limited in term infants, it can present as a severe infection in premature neonates, with sepsis-like symptoms, hepatitis or pneumonitis, and also laboratorial abnormalities such as thrombocytopenia, cholestasis and elevated CRP. Diagnosis can be obtained by Real Time Polimerase Chain Reaction (rtPCR) of a saliva, urine or blood sample, after excluding congenital infection. Antiviral treatment is not indicated in most cases, since these are often self-limited infections. However, ganciclovir use has been reported in selected infants with severe disease, although its efficacy and safety need further testing. In spite of the absence of association to neurosensorial hearing loss or impactful neurodevelopment abnormalities, it has been shown that infants with early postnatal CMV infection scored significantly lower than unaffected children on formal cognitive and motor assessments, but still within normal range. Therefore, prevention of the virus transmission becomes increasingly relevant, with different interventions to render breast milk non-infectious being studied. We report two cases of premature neonates who developed CMV infection postnatally, presenting thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and cholestasis, but with different disease severity, influencing the clinical approach.

Key words:

Citomegalovirus, breast milk, preterm infant, antiviral treatment, prevention

Índice

Glossário de siglas e abreviaturas.....	4
Introdução	5
Casos Clínicos	7
Caso Clínico 1	7
Caso Clínico 2.....	11
Discussão	15
Manifestações Clínicas	15
Diagnóstico	16
Terapêutica.....	17
Complicações / Sequelas	19
Prevenção.....	19
Conclusão.....	21
Agradecimentos	23
Bibliografia.....	24

Glossário de siglas e abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

CMV – Citomegalovírus

CMV-SLS – *Cytomegalovirus Sepsis-like Syndrome*

CPAP – *Continuous Positive Airway Pressure*

FA – Fosfatase Alcalina

FiO₂ – Fração Inspirada de Oxigênio

FIV – Fecundação *in vitro*

GGT – Gama-glutamilttransferase

Hb – Hemoglobina

IVIG – Imunoglobulina Intravenosa

IgA – Imunoglobulina A

PCR – Proteína C Reativa

RN – Recém-nascido

rtPCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction*

VAFO – Ventilação de Alta Frequência Oscilatória

Introdução

O Citomegalovírus (CMV) é uma das principais causas de infecção viral no mundo, sobretudo no contexto perinatal. Estima-se que a seroprevalência nos adultos ronde os 40-60% na Europa Ocidental, América do Norte e Austrália, e que seja acima dos 90% em países como o Brasil, África do Sul, Turquia, Índia e Japão, estando associada a piores condições socioeconómicas e sanitárias.^{1,2} Em recém-nascidos prematuros, a taxa de infecção por CMV adquirida no período pós-natal estimada é de 6.5% nos EUA.³

A infecção neonatal por CMV pode ser adquirida de forma congénita, *in útero*; no período perinatal, através do contacto com flora materna; ou pós-natal, através da transfusão de produtos sanguíneos, do leite materno ou por contacto direto, nomeadamente no contexto de cuidados de saúde. Atualmente, a transfusão de produtos sanguíneos CMV-seronegativos e leucorreduzidos previne eficazmente a transmissão de CMV em crianças prematuras, pelo que a amamentação se afigura como a principal via de transmissão pós-natal.^{1,4}

Estudos indicam que acima de 95% das mães seropositivas sofrem excreção do vírus para o leite materno durante a lactação, sem que haja evidência de reativação sistémica, sintomas ou alterações dos parâmetros laboratoriais. O mecanismo pelo qual esta reativação local nas glândulas mamárias ocorre ainda não está esclarecido, mas pode envolver alterações nas concentrações de citocinas.^{1,2,5} O ADN viral e viroláctia podem ser detetados ainda no colostro desde aproximadamente o 3º dia pós-parto, atingindo um pico de concentração máximo às 4-8 semanas, diminuindo progressivamente até às 9-12 semanas.^{1,2,6}

A taxa de transmissão em recém nascidos prematuros descrita na literatura é variável, sendo superior em unidades onde a alimentação é feita através de leite materno fresco, rondando os 37-59%, e menor em estudos em que foi utilizado leite congelado, que relatam taxas de transmissão entre os 2,5% e os 25%.^{1,7} A baixa idade gestacional constitui um fator de risco independente para a transmissão da infecção, sendo um dos mecanismos possíveis a reduzida transferência placentária de anticorpos antes das 28 semanas de gestação, traduzida por uma razão menor de IgG anti-CMV entre o recém-nascido e a mãe.^{1,8,9} Esta transferência passiva de anticorpos maternos ocorre ao longo do terceiro trimestre, sendo que os níveis de anticorpos aumentam gradualmente entre

as 28 e as 34-36 semanas de gestação.^{1,10,11} Adicionalmente, existe uma correlação positiva entre a taxa de transmissão e a elevada concentração de CMV no leite, a excreção prolongada do vírus e o aparecimento precoce de viroláctia ou ADN viral no leite.^{5,12}

Apesar da infeção pós-natal não estar tipicamente associada a infeção sintomática em crianças de termo, os grandes prematuros (<32 semanas de idade gestacional) ou de muito baixo peso ao nascer (<1500g) apresentam maior risco de apresentar manifestações clínicas, possivelmente devido à imaturidade do sistema imunitário e à já descrita reduzida transferência placentária de anticorpos IgG anti-CMV. Para além da baixa idade gestacional e do muito baixo peso à nascença, a precocidade da transmissão viral também aparenta constituir um fator de risco para que haja doença sintomática.^{1,2,10}

O risco de doença sintomática em prematuros descrito na literatura é extremamente variável (0-48%), mas aponta para que a infeção seja maioritariamente assintomática. Esta variabilidade pode ser devido a um subdiagnóstico de casos de infeção sintomática, devido à natureza transitória dos sinais e sintomas, e do facto de esta, por vezes, cursar apenas com alterações laboratoriais. A doença sintomática geralmente torna-se aparente entre os 35 e os 60 dias pós-parto.^{1,10}

Neste artigo, serão descritos dois casos clínicos recentes de infeção pós-natal por CMV no grande prematuro de um serviço de Neonatologia de nível terciário, cujas vias de transmissão foram aparentemente distintas, e com apresentações clínicas também diferentes. Tem-se como objetivo ilustrar as possíveis manifestações da infeção pós-natal por CMV em prematuros, e discutir as necessidades de terapêutica antiviral e de implementar medidas de prevenção da transmissão, ambos tópicos controversos na atualidade.

Casos Clínicos

Caso Clínico 1

Uma grávida de 35 anos, IO 1001, O Rh+, saudável, imune à rubéola e CMV nas serologias do 2º trimestre, não imune à toxoplasmose, recorre ao hospital por escassa hemorragia vaginal e contractilidade compatíveis com início de trabalho de parto. A gravidez decorreu sem intercorrências, com ecografias obstétricas sem alterações e restantes investigações dentro da normalidade. Foi realizado parto eutócico às 25 semanas e 4 dias de gravidez, de recém-nascido (RN) do sexo feminino, com peso ao nascer de 570g e índice de Apgar de 2/5/8, sem indução da maturação pulmonar. O RN foi entubado e ventilado na sala de partos, realizando 120mg de surfactante e sendo transferido para uma Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais de nível terciário.

O RN manteve-se em ventilação convencional no primeiro dia de vida (D1). Foi realizada radiografia de tórax, com aspetos sugestivos de doença de membrana hialina. A avaliação analítica à nascença revelou hemoglobina de 13,7 g/dL, leucocitose de 27 000 leucócitos/ μ l com neutrofilia, 175 000 plaquetas/ μ l e PCR de 3,1 mg/dL, compatível com sépsis precoce, com isolamento posterior de *Listeria monocytogenes* em hemocultura colhida em D1. Iniciou antibioterapia empírica em D1 com ampicilina e gentamicina, e profilaxia antifúngica com fluconazol.

Do ponto de vista respiratório, sob ventilação convencional desde o primeiro dia de vida, mantendo-se estável até D30 mas com necessidade de parâmetros ventilatórios elevados, optando-se por iniciar nesta altura protocolo de hidrocortisona por displasia broncopulmonar com dependência de ventilação invasiva.

Do ponto de vista cardiovascular, manteve-se hemodinamicamente estável, tendo realizado ecocardiograma em D3, com presença de *foramen ovale* patente pequeno com shunt-esquerdo-direito, sem persistência do canal arterial e com boa função global.

Relativamente a intercorrências infecciosas, cumpriu 11 dias de gentamicina e 21 dias de ampicilina por sépsis precoce a *Listeria monocytogenes*. Em D4 foi isolado *Pseudomonas aeruginosa* nas secreções brônquicas, sensível a gentamicina. Por manter isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em D11, associado a leucocitose de 40 390 leucócitos/ μ l, neutrofilia e PCR de 0,54 mg/dL, iniciou ceftazidima, que cumpriu durante 11 dias. Em D13, foi isolado em hemocultura *Staphylococcus epidermidis*,

sensível a vancomicina, que cumpriu durante 10 dias. Em D22 iniciou piperacilina-tazobactam por aumento dos parâmetros de infecção, com PCR de 1,6 mg/dL, mantendo leucocitose de 22 420 leucócitos/ μ l, tendo cumprido 10 dias de antibioterapia.

Do ponto de vista alimentar, sob alimentação parentérica desde D1, tendo iniciado alimentação entérica em D3, com tolerância progressiva. A partir de D11, manteve-se exclusivamente sob nutrição entérica com leite materno e fórmula especial para prematuros.

Do ponto de vista neurológico, RN com exame neurológico adequado à idade gestacional, com ecografias seriadas demonstrando hiperecogenicidade periventricular ligeira em D2, e hemorragia grau 2 à esquerda com coágulo no corno occipital em D9. Repetiu ecografia em D17 e D23, observando-se reabsorção do coágulo.

Em D45 de vida, verificou-se agravamento dos parâmetros ventilatórios, com maior necessidade de FiO₂, com tradução radiológica de hipotransparência heterogênea à direita, e acompanhada de quadro de prostração e subida da PCR (3,0 mg/dL). Iniciou VAFO e procedeu-se à cultura das secreções brônquicas, com novo isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* sensível piperacilina-tazobactam, que cumpriu durante 8 dias.

No dia seguinte, ao exame objetivo, verificou-se aparecimento de petéquias dispersas pelo corpo, associado a trombocitopénia de 83 000 plaquetas/ μ l, tendo sido prescrito concentrado de plaquetas, sem intercorrências. Foi ainda objetivada distensão abdominal, não sendo evidentes nesta altura massas ou organomegalias. Por suspeita de sépsis fúngica, iniciou micafungina. Nos dias seguintes, mantinha o abdómen globoso embora mole e depressível, com perda progressiva de tolerância para a alimentação entérica, que foi suspensa em D52 devido ao contínuo agravamento. A alteração da contagem de plaquetas mantinha-se em D52 (50 000 plaquetas/ μ l), D55 (23 000 plaquetas/ μ l) e D56 (48 000 plaquetas/ μ l), tendo sido necessária a administração de mais 2 unidades de concentrado de plaquetas em D55 e D56. Outras alterações laboratoriais síncronas com este quadro incluíam: AST 162 U/L e ALT 30,9 U/L em D55. Um resumo dos resultados laboratoriais encontra-se explicitado abaixo, na Tabela 1. Em D55, objetivou-se hepatoesplenomegália, confirmada por ecografia abdominal.

Pela manutenção da trombocitopénia associada a hepatoesplenomegália, foi realizada a pesquisa de CMV por *Real Time Polymerase Chain Reaction* (rtPCR) na urina, com resultado positivo ($>1.000.000$ cópias/ml) em D59.

Decidiu-se não iniciar terapêutica antiviral, uma vez que houve melhoria clínica espontânea aquando da deteção do vírus. Registou-se melhoria dos parâmetros respiratórios (com extubação em D59 para ventilação não invasiva), aumento da tolerância à alimentação entérica, diminuição da hepatoesplenomegália ao exame objetivo, aumento progressivo do número de plaquetas e resolução do quadro de prostração. As restantes alterações laboratoriais apresentaram igualmente resolução progressiva. Procedeu-se ainda à pesquisa de ADN CMV no cartão de Guthrie, que mais tarde se revelou ser negativa, assim como à pesquisa de CMV no leite materno por rtPCR em D62, que foi positiva (549,6 cópias/ml), pelo que se decidiu suspender o aleitamento materno.

Em D88 foi realizada nova pesquisa no leite materno, desta vez negativa.

O RN manteve uma evolução favorável durante o restante internamento, tendo alta com 103 dias de vida, 40 semanas de idade corrigida, pesando 2304 g ($<P3$). À data da alta tolerava bem a alimentação com leite especial para prematuros, mantendo ainda necessidade de oxigénio por óculos nasais a 0,25 L/min no contexto de displasia broncopulmonar. A ecografia cerebral realizada na idade equivalente ao termo não apresentava alterações de relevo, e o RN passou nos potenciais auditivos evocados. A avaliação seriada por Oftalmologia revelou retinopatia da prematuridade grau II, sem outras alterações. Os diagnósticos principais na altura da alta, além de infeção por CMV, incluíam: sépsis precoce a *Listeria monocytogenes*, sépsis tardia a *Staphylococcus epidermidis*, anemia multifatorial, pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa*, suspeita de sépsis fúngica não confirmada, trombocitopénia, displasia broncopulmonar moderada e retinopatia da prematuridade grau II. Em contexto da sua prematuridade e do curso clínico, o RN teve alta com programação de seguimento multidisciplinar.

Dia	42	46	48	52	55	56	58	61	66	69	76	94
Hb (g/dL)	14,6	12,1	10,8	12,5	12,2	14,7	12,6	12,7	11,1	9,6	14,1	9,0
Plaquetas (10³/μl)	116	83	-	50	23	48	74	96	104	133	187	257
PCR (mg/dL)	1,1	3	1,5	3,5	1,8	0,9	0,2	0,5	0,8	0,5	0,6	<0,4
AST (U/L)	-	-	-	90	162	-	74	77	86	56	73	60
ALT (U/L)	-	-	-	41	30,9	-	48	44	63	36	37	38
Bilirrubina total (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	4,96	5,7	5,27	2,96	-
Bilirrubina direta. (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	4,42	-	4,82	2,66	-
GGT (U/L)	-	-	-	-	-	-	-	413	319	394	466	237
FA (U/L)	-	-	-	-	-	-	-	685	-	777	416	481

Tabela 1 - Caso Clínico 1: Evolução analítica durante o internamento

Caso Clínico 2

Uma mulher de 31 anos, IO 0000, O Rh+, com antecedentes de endometriose, com gravidez medicamente assistida (FIV), gemelar monocoriônica biamniótica, encontra-se internada para vigilância desde as 19 semanas de gestação, após diagnóstico de síndrome de transfusão feto-fetal, e subsequente coagulação das anastomoses vasculares. A gravidez decorreu sem outras intercorrências, e as serologias revelaram imunidade à rubéola, não imunidade à toxoplasmose, não tendo sido realizadas serologias para o CMV. Ocorreu morte *in utero* do primeiro feto às 25 semanas, tendo sido nesta altura feita indução da maturação pulmonar completa com betametasona. Às 26 semanas e 1 dia, por prolapso do cordão umbilical, foi realizada cesariana de emergência de recém-nascido do sexo masculino, com peso ao nascer de 649 g e índice de Apgar de 5/4/8. O RN foi entubado e ventilado na sala de partos, realizando 120 mg de surfactante e sendo transferido para Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais de nível terciário.

A avaliação analítica à nascença revelou hemoglobina de 18,0 g/dL, 4 820 leucócitos/ μ L, 118 000 plaquetas/ μ L e PCR de 0,1 mg/dL, e a hemocultura colhida no primeiro dia de vida foi negativa, tendo iniciado antibioterapia empírica com ampicilina e gentamicina, que cumpriu durante 10 dias, e profilaxia antifúngica com fluconazol. Foi realizada radiografia de tórax, sugestiva de doença da membrana hialina grau II/III.

A nível respiratório, manteve-se sob ventilação mecânica até D64, com agravamento progressivo dos parâmetros e necessidade por períodos de FiO₂ até 100%. A partir de D13 o suporte ventilatório foi alterado de ventilação convencional para ventilação de alta frequência, sempre com necessidade de parâmetros agressivos.

Do ponto de vista cardiovascular, manteve-se hemodinamicamente estável ao longo do internamento. Realizou ecocardiograma em D4 e D8 de vida, com persistência de canal arterial mínimo, que se mantinha em D13, embora não significativo.

Do ponto de vista infeccioso, a destacar início em D10 quadro clínico sugestivo de sépsis com pneumonia, com subida de PCR até 2,0 mg/dL, tendo iniciado vancomicina e imipenem que cumpriu durante 10 dias, com isolamento em hemocultura de *Staphylococcus epidermidis*. Em D24, por aumento de secreções respiratórias, feita colheita com isolamento de *Enterobacter aerogenes*, tendo iniciado cefotaxime e gentamicina em D26, que cumpriu durante 10 dias.

Do ponto de vista alimentar, sob alimentação parentérica desde D1, tendo iniciado alimentação entérica mínima em D2, com tolerância progressiva. A partir de D13, manteve-se exclusivamente sob alimentação entérica, com leite materno e fórmula especial para prematuros.

Do ponto de vista neurológico, o exame neurológico era adequado à idade gestacional, com ecografias seriadas demonstrando plexo globoso à direita em D1; hiperecogenecidade peri-ventricular bilateral ligeira a moderada, assimetria ventricular, sem hemorragia aparente em avaliações subsequentes.

Em D33 o RN iniciou quadro de discreta distensão abdominal, embora mantivesse tolerância à alimentação entérica e relativa estabilidade a nível respiratório, apesar de necessitar de manter parâmetros ventilatórios elevados, com FiO₂ 60-70% em VAFO.

Após 3 dias, em D36, verificou-se subida da PCR (2,08 mg/dL) e trombocitopénia (99 000 plaquetas/ μ l), encontrando-se no 10º dia de terapêutica com cefotaxime e gentamicina. Por suspeita de sépsis fúngica, foram colhidas hemoculturas, que foram negativas, e iniciada micafungina, que cumpriu durante 10 dias. Nos dias seguintes manteve trombocitopénia (66 000 plaquetas/ μ l em D38), apesar de diminuição de parâmetros inflamatórios (PCR 0,8 mg/dL). Por manter o quadro de distensão abdominal e trombocitopénia, pesquisou-se o CMV na urina por rtPCR, com a detecção de 7331 cópias/mL em D42. Apresentou posteriormente agravamento clínico com palidez, agravamento respiratório, com polipneia e tiragem, sendo objetivada hepatoesplenomegália, manutenção de trombocitopénia e nova subida de PCR (6,2 mg/dl), isolando-se novamente *Enterobacter aerogenes* nas secreções brônquicas, tendo iniciado imipenem e vancomicina, que cumpriu durante 10 dias.

Foi colhida amostra de leite materno, onde não foi detetada presença de ADN viral, e realizadas serologias maternas para o CMV, que foram negativas. Foi ainda pesquisado ADN viral no cartão de Guthrie, também negativo.

Nos dias seguintes ao isolamento de CMV, o RN mantinha-se instável a nível respiratório, mantendo ainda hepatoesplenomegália. Realizou reavaliação cardíaca nesta altura, com boa função global, não se verificando persistência do canal arterial. Do ponto de vista laboratorial, a destacar trombocitopénia com necessidade de várias transfusões de concentrados plaquetários, nomeadamente em D46, D51, D52, D53, D54

e D55. Verificou-se ainda um padrão colestático e discreto aumento das transaminases, acompanhado de icterícia. Foi pedida nova rtPCR, desta vez de uma amostra de sangue, determinando-se uma carga viral de 20198 cópias/mL. O resumo das alterações laboratoriais encontra-se disponível na Tabela 2.

Devido ao contínuo agravamento respiratório, à organomegália sem melhoria e necessidade frequente de transfusões de concentrados plaquetários, o caso foi discutido com a Infecçiology Pediátrica, e decidiu-se iniciar terapêutica com ganciclovir em D52, na dose de 6mg/kg em 2 tomas por dia. Iniciou na mesma altura ácido ursodesoxicólico devido à colestase.

Após início da terapêutica, verificou-se uma evolução clínica favorável, com diminuição das necessidades de FiO₂ e extubação para CPAP em D63, diminuição progressiva da hepatoesplenomegália e subida do número de plaquetas (61 000 plaquetas/ μ l em D58).

No 12º dia de terapêutica antiviral, realizou-se nova rtPCR do plasma, com descida para 3503 cópias/ml.

Por quadro de hepatite, com elevação das transaminases (AST 429 U/L, ALT 311 U/L, GGT 551 U/L), suspendeu-se o ganciclovir após 14 dias de terapêutica. Em nova rtPCR do plasma realizada 12 dias após suspensão do ganciclovir, foram detetadas 877 cópias/mL. Nesta altura, já não se palpava hepatomegália e os parâmetros hepáticos encontravam-se em fase descendente, normalizando nos dias seguintes.

Verificou-se melhoria clínica progressiva, e o RN teve alta com 114 dias de vida, 42 semanas de idade corrigida, pesando 2365 g (<P3), ainda com necessidade de oxigénio por óculos nasais a 0,25 L/min no contexto de displasia broncopulmonar. Passou no rastreio auditivo com potenciais evocados, e realizou ecografia transfontanelar, que na idade equivalente ao termo revelou discreta hiperecogenicidade dos vasos lenticuloestriados, sem outras alterações. A avaliação oftalmológica seriada revelou retinopatia da prematuridade grau II, sem outras alterações. Os diagnósticos principais na altura da alta, além de infeção por CMV, incluíam: sépsis tardia a *Staphylococcus epidermidis*, sépsis tardia sem agente isolado, isolamento nas secreções brônquicas de *Enterobacter aerogenes*, colestase, anemia multifatorial, trombocitopénia, displasia broncopulmonar grave e a referida retinopatia. Em contexto

da sua prematuridade e do curso clínico, o RN teve alta com seguimento multidisciplinar agendado.

Dia	36	38	40	43	45	47	51	52	53	58	66	82
Hb (g/dL)	12,6	11,5	9,9	8,5	11,6	10,0	13,5	10,9	14,5	12,2	12	10
Plaquetas (10³/µl)	99	66	54	52	43	-	30	39	46	61	305	381
PCR (mg/dL)	2,08	0,8	1	6,2	3,19	0,9	0,2	0,5	0,8	0,54	0,24	0,1
AST (U/L)	28	-	-	-	51	-	-	-	-	167	429	111
ALT (U/L)	9	-	-	-	15	-	-	-	-	60	311	80
Bilirrubina total (mg/dL)	1,15	-	-	-	5,51	-	-	4,96	-	9,1	11,81	4,5
Bilirrubina direta (mg/dL)	3,32	-	-	-	4,26	-	-	4,42	-	7,19	9,17	3,7
GGT (U/L)	287	-	-	-	254	-	-	413	319	-	551	389
FA (U/L)	528	-	-	-	388	-	-	-	-	-	783	694

Tabela 2 - Caso Clínico 2: Evolução analítica durante o internamento

Discussão

Manifestações Clínicas

A apresentação clínica da infecção sintomática por CMV é variável, num espectro que vai desde doença ligeira e auto-limitada, por vezes manifestada apenas por alterações laboratoriais transitórias, a doença grave ou *life-threatening*, afetando diversos órgãos e sistemas. Contudo, a mortalidade por infecção pós-natal é extremamente rara.¹⁰

A síndrome *sepsis-like* por CMV (CMV-SLS), também designado de sintomas *sepsis-like*, foi um termo introduzido para descrever a tríade de sintomas comumente associados com a infecção pós-natal de CMV em prematuros: apneias, bradicardia e *gray palor*. Outros sinais e sintomas que podem estar presentes incluem hepatite aguda, hepatoesplenomegália e pneumonite intersticial difusa com necessidade de ventilação invasiva. Adicionalmente, é possível existir envolvimento gastrointestinal com distensão abdominal, diarreia, enterocolite, estenose, perfuração intestinal e volvo. Linfadenopatias, icterícia e petéquias também estão descritos.^{7,10,13,14} Nos nossos casos, verificou-se a presença de distensão abdominal e hepatoesplenomegália em ambos os pacientes, concomitantemente à perda progressiva de tolerância alimentar e à presença de um agravamento respiratório importante, com tradução imagiológica, no caso clínico 1. No segundo caso, de realçar também a palidez objetivada. Para além disso, existe um risco aumentado de displasia broncopulmonar, possivelmente relacionado com dano no tecido pulmonar derivado do efeito patogénico direto e do processo inflamatório secundário, e pela exposição aumentada a outros fatores de risco conhecidos para esta patologia, nomeadamente o uso de ventilação mecânica, tal como aconteceu com os nossos dois pacientes.^{15,16}

Laboratorialmente, a alteração mais comum é a trombocitopenia, presente na maioria dos prematuros com infecção sintomática, sendo que cerca de metade tem uma contagem de plaquetas inferior a 100,000 U/L. Também é frequente apresentarem neutropenia, elevação das enzimas hepáticas, colestase e um aumento ligeiro da PCR, que atinge valores máximos entre 10 e 20 mg/L.^{2,15,17} Nos nossos casos, tanto a trombocitopenia como a subida ligeira da PCR estiveram presentes, sendo que se verificou ainda um padrão colestático mais evidente no caso clínico 2. Muitas vezes, estas alterações são as únicas manifestações da infecção sintomática, constituindo

achados incidentais durante o internamento destes prematuros. Apesar de poderem existir várias outras causas, nomeadamente, outros agentes infecciosos, a pesquisa de infeção por CMV pode estar indicada neste grupo etário, especialmente quando coexistem outros sinais ou sintomas que, embora inespecíficos, também estejam associados à infeção pós-natal por este agente. Nestes dois casos em particular, a manutenção da trombocitopénia apesar de terapêutica antibiótica, associada à hepatoesplenomegália ditaram a decisão de pesquisar especificamente este agente.

Relativamente a alterações imagiológicas, a análise seriada de ecografias cerebrais desde o nascimento com o aparecimento de calcificações cerebrais ou vasculopatia lenticuloestriada, em idade equivalente ao termo, está significativamente associada a infeção pós-natal por CMV.⁸ Um exemplo do mesmo é o RN do caso clínico 2, que apresentava esta alteração.

Recentemente, tem-se vindo a identificar alguns fatores que aparentam ser preditivos de doença grave. Os mais estabelecidos são a baixa idade gestacional e o extremo baixo peso ao nascer, com maior risco de doença grave e necessidade prolongada de suporte ventilatório.^{10,18} Em ambos os casos, os RN tinham baixa idade gestacional (25 semanas e 4 dias, e 26 semanas e 1 dia) e extremo baixo peso (570g e 649g), tendo desenvolvido infeção sintomática com necessidade de ventilação prolongada, por vezes com parâmetros ventilatórios elevados. Devido ao seu sistema imunitário ainda estar subdesenvolvido e à existência de sistemas de órgãos ainda não totalmente desenvolvidos, o prematuro dispõe de uma alta morbilidade prévia associada, que pode ser agravada pela infeção. Desta forma, tem sido proposto que a infeção pós-natal a CMV atua como um cofator que agrava o curso clínico de patologias pré-existentes em alguns recém-nascidos prematuros, nomeadamente pulmonar, hematológica ou hepática, mas que raramente apresenta sintomatologia em recém-nascidos prematuros, fora isso, saudáveis.^{17,18}

Diagnóstico

Atualmente, a deteção de CMV por *Real Time Polymerase Chain Reaction* (rtPCR) em amostras de urina, sangue ou saliva é o método mais utilizado para o diagnóstico de infeção pós-natal de CMV. Apesar de ser mais fácil de obter, a utilização de amostras de saliva revelou ter uma menor sensibilidade que a urina para a deteção viral, pelo que esta última é recomendada. Adicionalmente, a amostra de saliva pode

sofrer contaminação com leite materno infetado.^{10,19} Desta forma, em ambos os nossos casos foi realizada pesquisa do CMV através de rtPCR de amostras de urina.

Uma cultura ou rtPCR positivas para CMV de uma amostra colhida nas primeiras 3 semanas após o parto são geralmente indicativas de infecção congénita por CMV. Desta forma, uma amostra negativa para CMV nas primeiras 3 semanas pós-parto seguida de uma amostra positiva é indicativa de infecção pós-natal por CMV. Contudo, está documentada a deteção de vírus a partir do 12º dia após o parto em prematuros com infecção pós-natal.¹⁰ A exclusão de infecção congénita por CMV também pode ser realizada retrospectivamente, através da identificação do vírus no cartão de Guthrie. Contudo, este é um método pouco sensível.²⁰ Nos nossos casos em particular, a infecção congénita a CMV foi excluída retrospectivamente através da pesquisa de ADN viral no cartão de Guthrie, uma vez que não foi realizado rastreio de infecção nas primeiras 3 semanas.

No primeiro caso, assumiu-se que a infecção resultou da transmissão através do leite materno, uma vez que se detetou a presença de ADN viral no mesmo e de esta ser, atualmente, a principal fonte de transmissão pós-natal. Pelo contrário, no caso clínico 2, não se encontrou ADN viral no leite materno e as serologias maternas para o CMV foram negativas. Assim, visto que foi excluída a transmissão pelo leite materno, e considerando que a leucorredução de produtos sanguíneos para transfusão previne eficazmente a transmissão de CMV, foi colocada a hipótese de a transmissão ter sido horizontal por contacto direto no contexto de cuidados de saúde, uma vez que ambos os recém-nascidos estiveram internados na mesma unidade durante o mesmo período de tempo.

Terapêutica

Por se tratar habitualmente de uma doença assintomática ou auto-limitada, não está recomendada terapêutica dirigida para a infecção pós-natal por CMV de uma forma geral. Na doença grave, pode ser realizada terapêutica antiviral ou com recurso a imunoglobulinas anti-CMV. Contudo, existe pouca informação disponível relativamente à sua eficácia e segurança, sendo a sua utilização baseada apenas em casos clínicos individuais.^{1,10} Uma vez que no primeiro caso descrito houve uma melhoria espontânea do quadro clínico apresentado, optou-se por não se instituir terapêutica. Por outro lado,

o RN do caso clínico 2 apresentava um agravamento progressivo do quadro, pelo que se decidiu iniciar terapêutica antiviral com ganciclovir.

O ganciclovir aparenta ser eficaz em recém-nascidos de termo com infecção congénita por CMV, estando associado a melhores resultados a nível do neurodesenvolvimento. Porém, a sua eficácia não foi ainda estabelecida em prematuros com infecção perinatal.¹⁰

A utilização incidental de ganciclovir, ou do seu derivado oral valganciclovir, em casos de doença grave tem sido associada a uma melhoria do quadro clínico e normalização dos parâmetros analíticos, paralelamente a uma redução da carga viral, podendo-se alcançar inclusivamente a ausência de ADN viral detetável. Após a suspensão da terapêutica antiviral, pode ser observada excreção viral assintomática.^{2,10,21} No nosso paciente, observou-se uma melhoria da sintomatologia associada à infecção viral, acompanhada de uma melhoria dos valores laboratoriais e da necessidade de transfusões de concentrados plaquetários. Adicionalmente, verificou-se uma diminuição progressiva da carga viral desde o início da terapêutica, que se manteve após a suspensão da mesma.

Atualmente, desconhece-se qual a dose e duração ideal da terapêutica em recém-nascidos prematuros. Geralmente, a terapêutica consiste na administração de ganciclovir intravenoso ou valganciclovir oral durante, em média, 4 a 6 semanas, em doses variáveis entre 5-12 mg/kg de ganciclovir de 12/12 horas por dia.^{1,10}

Existem vários efeitos adversos associados ao ganciclovir, nomeadamente neutropénia persistente, supressão medular, colestase, hipocaliémia e lesão renal. Assim, a utilização deste fármaco deve ser equacionada tendo em conta os potenciais benefícios e riscos do mesmo. Caso se inicie terapêutica farmacológica, a toxicidade da terapêutica antiviral deve ser monitorizada.^{10,21} Relativamente ao nosso caso em particular, houve necessidade de se suspender a terapêutica após 14 dias, devido ao aumento da enzimologia hepática e dos parâmetros de colestase, com resolução espontânea nos dias seguintes.

Existem estudos que reportam a utilização de imunoglobulina intravenosa (IVIG) com anticorpos contra o CMV para prevenção e tratamento da infecção perinatal em

prematturos. Contudo, não existe ainda evidência da sua eficácia e segurança, sendo necessária mais investigação nesta área.^{1,10}

Complicações / Sequelas

As consequências da infecção adquirida por CMV não se limitam apenas às manifestações nas primeiras semanas de vida, mas incluem também um conjunto de sequelas possíveis a curto e longo prazo.

A infecção congénita por CMV é uma das principais causas não-genéticas de surdez neurosensorial. Porém, esta associação não parece existir na infecção pós-natal.^{10,22–25} Para além disso, não foram relatadas diferenças na prevalência de paralisia cerebral, nem de alterações antropométricas.^{23,26}

Relativamente ao neurodesenvolvimento, este aparenta manter-se inalterado no início da infância, até cerca dos 5 anos de idade, não se verificando diferenças significativas no desenvolvimento psicomotor e mental entre crianças previamente infetadas e não-infetadas.^{22,24,27} A longo prazo, a maioria dos estudos sugere que, a partir dos 6 anos de idade, apesar do neurodesenvolvimento ocorrer dentro dos parâmetros da normalidade, as crianças alvo desta infecção apresentam piores *scores* cognitivos e motores comparativamente a crianças não infetadas. Desta forma, a infecção nos prematturos aparenta afetar sobretudo funções neurocognitivas mais complexas que apenas se desenvolvem mais tarde durante a infância, sendo recomendado o *follow-up* destas crianças a longo-prazo.^{10,23,24,26,27}

Prevenção

A preocupação relativamente à existência de potenciais sequelas a curto e longo prazo da infecção perinatal por CMV em prematturos levou a que se tenha vindo a discutir a implementação de estratégias de prevenção da transmissão viral.

A prevenção da infecção pós-natal passa sobretudo pela substituição do leite materno por leite de fórmula, ou pelo tratamento do mesmo tendo em vista a eliminação do risco de transmissão por esta via. Contudo, a amamentação com leite materno tem inúmeros benefícios para o bebé, especialmente para os prematturos, estando associado a menor incidência de várias patologias, nomeadamente enterocolite necrotizante, sépsis, retinopatia da prematuridade, entre outros. Por isso, associações como a *American Academy of Pediatrics* continuam a recomendar o aleitamento materno mesmo nos

casos de mães seropositivas, visto os benefícios do leite materno serem superiores aos riscos de doença clínica.²⁸

Relativamente ao tratamento do leite, o seu objetivo consiste em eliminar eficazmente o vírus do mesmo, mas mantendo as propriedades nutricionais e imunológicas.

Uma das técnicas utilizadas consiste no congelamento do leite materno a -20°C entre 18h e 10 dias. Este método diminui significativamente a concentração viral no leite, mas não elimina o vírus por completo, existindo ainda risco de transmissão, apesar de menor quando comparado com leite não tratado. Uma vantagem desta técnica é o facto de preservar os fatores nutricionais e protetores do leite, tais como atividade enzimática da lipase e fosfatase alcalina, atividade lisossomal e níveis de IgA secretória.^{1-3,29,30}

Outro método usado é a pasteurização de Holder, que consiste no aquecimento de leite a 62,5°C durante 30 minutos. Através deste método é possível inativar eficazmente o CMV no leite, mas tem como desvantagem o facto de reduzir a concentração de proteínas com função imunoprotetora, tais como a lactoferrina, lisozima e IgA secretória.²⁹⁻³¹

Recentemente, tem sido estudado a utilização da pasteurização por curto-prazo para a eliminação do CMV no leite materno, através do aquecimento do leite a 62°C durante 5 segundos. Esta técnica permite uma redução da taxa de transmissão da infeção viral semelhante à pasteurização de Holder, mas preservando os componentes nutricionais e imunológicos do leite materno. Porém, este é um método moroso, que necessita de um processamento extremamente preciso e, por conseguinte, de formação constante de todo o corpo de enfermagem.^{2,30,32}

Existe ainda outra técnica descrita como capaz de eliminar o vírus eficazmente – inativação do CMV no leite materno através de irradiação Ultravioleta-C a 254 nm. Estudos têm demonstrado que este método elimina a replicação viral e reduz significativamente a concentração de proteínas virais intracelulares, preservando simultaneamente os componentes biológicos do leite de forma mais eficaz que a pasteurização de Holder. Contudo, são necessários mais estudos para avaliar a eficácia

deste método e potenciais efeitos adversos antes de ser recomendado o seu uso rotineiro.^{2,31}

Relativamente às restantes vias de transmissão, a leucorredução dos produtos sanguíneos e a correta higienização das mãos dos profissionais de saúde e material médico previnem eficazmente a transmissão viral.

Conclusão

A infeção pós-natal a Citomegalovírus é uma patologia muitas vezes subestimada e subdiagnosticada, visto que na maioria dos casos consiste numa infeção assintomática ou apenas associada a alterações laboratoriais, acompanhadas ou não de sintomas ligeiros e inespecíficos, sobretudo em crianças de termo. Contudo, recém-nascidos prematuros apresentam maior risco para doença grave ou possivelmente *life-threatening*, especialmente com idades gestacionais mais baixas.

Desta forma, com os casos clínicos previamente descritos, pretende-se alertar para a possível extensão destes quadros virais, e demonstrar a importância de suspeitar de infeção pós-natal a CMV em recém-nascidos prematuros, internadas em Unidades de Cuidados Intensivos, nomeadamente filhos de mães seropositivas, sob aleitamento materno, que apresentem quadros infecciosos inespecíficos acompanhados de manifestações como trombocitopenia, hepatoesplenomegalia, colestase ou sintomas *sepsis-like* sem resolução com antibioterapia.

Apesar de constituir muitas vezes uma infeção auto-limitada, o uso de terapêutica antiviral como o ganciclovir aparenta ter benefícios nos casos mais graves. Porém, os possíveis efeitos adversos deste fármaco devem sempre ser tidos em conta no momento de instituir a terapêutica. Para além disso, são necessários mais estudos para determinar a eficácia e segurança da sua utilização na infeção aguda e na prevenção de possíveis sequelas neurossensoriais, e estabelecer um protocolo de *follow-up* consensual.

A prevenção assume-se assim como um tópico cada vez mais discutido na literatura. Devido à extrema importância do aleitamento materno nos recém-nascidos prematuros, têm vindo a ser desenvolvidas várias estratégias de forma a minimizar, ou até eliminar, o risco de transmissão de CMV através do leite. Contudo, mais investigações têm de ser realizadas de forma a desenvolver um método que seja passível

de ser aplicado globalmente que elimine eficazmente a carga viral no leite materno, mantendo simultaneamente as suas propriedades nutricionais e imunológicas.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr.^a Inês Pires do Carmo Passão Girbal, por toda a disponibilidade e constante apoio, assim como pelas indispensáveis críticas, opiniões e correções que tornaram este trabalho possível. Agradeço-lhe ainda por toda a ajuda a analisar os vários volumes de diários clínicos, sem a qual nada disto seria possível.

À minha família, namorada e amigos, pelo apoio incondicional, incentivo, ajuda e motivação constante.

Bibliografia

1. Lombardi, G., Garofoli, F., Manzoni, P., and Stronati, M. (2012). Breast milk-acquired cytomegalovirus infection in very low birth weight infants. *J. Matern. Neonatal Med.* 25, 57–62.
2. Hamprecht, K., and Goelz, R. (2016). Postnatal Cytomegalovirus Infection Through Human Milk in Preterm Infants. *Clin. Perinatol.* 44, 121–130.
3. Lanzieri, T.M., Dollard, S.C., Josephson, C.D., Bialek, S.R., and Schmid, D.S. (2013). Breast Milk-Acquired Cytomegalovirus Infection and Disease in VLBW and Premature Infants. *Pediatrics* 131, e1937–e1945.
4. Josephson, C.D., Caliendo, A.M., Easley, K.A., Knezevic, A., Shenvi, N., Hinkes, M.T., Patel, R.M., Hillyer, C.D., and Roback, J.D. (2014). Blood transfusion and breast milk transmission of cytomegalovirus in very low-birth-weight infants: A prospective cohort study. *JAMA Pediatr.* 168, 1054–1062.
5. Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C.P., and Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 357, 513–518.
6. Hayashi, S., Kimura, H., Oshiro, M., Kato, Y., Yasuda, A., Suzuki, C., Watanabe, Y., Morishima, T., and Hayakawa, M. (2011). Transmission of cytomegalovirus via breast milk in extremely premature infants. *J. Perinatol.* 31, 440–445.
7. Kurath, S., Halwachs-Baumann, G., Müller, W., and Resch, B. (2010). Transmission of cytomegalovirus via breast milk to the prematurely born infant: A systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1172–1178.
8. Nijman, J., De Vries, L.S., Koopman-Esseboom, C., Uiterwaal, C.S.P.M., Van Loon, A.M., and Verboon-Macielek, M.A. (2012). Postnatally acquired cytomegalovirus infection in preterm infants: A prospective study on risk factors and cranial ultrasound findings. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* .
9. Nijman, J., van Loon, A.M., Krediet, T.G., and Verboon-Macielek, M.A. (2013). Maternal and neonatal anti-cytomegalovirus IgG level and risk of postnatal

cytomegalovirus transmission in preterm infants. *J. Med. Virol.* 85, 689–695.

10. Gunkel, J., Wolfs, T.F., De Vries, L.S., and Nijman, J. (2014). Predictors of severity for postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants and implications for treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1345–1355.
11. Mussi-Pinhata, M.M., Pinto, P.C.G., Yamamoto, A.Y., Berencsi, K., Sandoval de Souza, C.B., Andrea, M., Duarte, G., and Jorge, S.M. (2003). Placental transfer of naturally acquired, maternal cytomegalovirus antibodies in term and preterm neonates. *J. Med. Virol.* 69, 232–239.
12. Jim, W.-T., Shu, C.-H., Chiu, N.-C., Chang, J.-H., Hung, H.-Y., Peng, C.-C., Kao, H.-A., Wei, T.-Y., Chiang, C.-L., and Huang, F.-Y. (2009). High Cytomegalovirus Load and Prolonged Virus Excretion in Breast Milk Increase Risk for Viral Acquisition by Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 891–894.
13. Cheong, J.L.Y., Cowan, F.M., and Modi, N. (2004). Gastrointestinal manifestations of postnatal cytomegalovirus infection in infants admitted to a neonatal intensive care unit over a five year period. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 89, F367-9.
14. Goelz, R., Hamprecht, K., Klingel, K., and Poets, C.F. (2016). Intestinal manifestations of postnatal and congenital cytomegalovirus infection in term and preterm infants. *J. Clin. Virol.* 83, 29–36.
15. Mukhopadhyay, S., Meyer, S.A., Permar, S.R., and Puopolo, K.M. (2016). Symptomatic Postnatal Cytomegalovirus Testing among Very Low-Birth-Weight Infants: Indications and Outcomes. *Am. J. Perinatol.* 33, 894–902.
16. Kelly, M.S., Benjamin, D.K., Puopolo, K.M., Laughon, M.M., Clark, R.H., Mukhopadhyay, S., Brian Smith, P., and Permar, S.R. (2015). Postnatal cytomegalovirus infection and the risk for bronchopulmonary dysplasia. *JAMA Pediatr.* 169, e153785.
17. Neuberger, P., Hamprecht, K., Vochem, M., Maschmann, J., Speer, C.P., Jahn, G., Poets, C.F., and Goelz, R. (2006). Case-control study of symptoms and neonatal outcome of human milk-Transmitted cytomegalovirus infection in

- premature infants. *J. Pediatr.* 148, 326–331.
18. Mehler, K., Oberthuer, A., Lang-Roth, R., and Kribs, A. (2014). High rate of symptomatic cytomegalovirus infection in extremely low gestational age preterm infants of 22-24 weeks' gestation after transmission via breast milk. *Neonatology* 105, 27–32.
 19. Gunkel, J., Wolfs, T.F.W., Nijman, J., Schuurman, R., Verboon-Maciolek, M.A., de Vries, L.S., and Murk, J.L. (2014). Urine is superior to saliva when screening for postnatal CMV infections in preterm infants. *J. Clin. Virol.* 61, 61–64.
 20. Kadambari, S., Luck, S., Heath, P.T., and Sharland, M. (2016). Preemptive screening strategies to identify postnatal CMV diseases on the neonatal unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 1148–1150.
 21. Sunada, M., Kinoshita, D., Furukawa, N., Kihara, M., Nishimura, A., Moriuchi, M., and Moriuchi, H. (2016). Therapeutic drug monitoring of ganciclovir for postnatal cytomegalovirus infection in an extremely low birth weight infant: a case report.
 22. Jim, W.T., Chiu, N.C., Ho, C.S., Shu, C.H., Chang, J.H., Hung, H.Y., Kao, H.A., Chang, H.Y., Peng, C.C., Yui, B.H., and Chuu, C.P. (2015). Outcome of preterm infants with postnatal cytomegalovirus infection via breast milk: A two-year prospective follow-up study. *Med. (United States)* 94.
 23. Bevot, A., Hamprecht, K., Krägeloh-Mann, I., Brosch, S., Goelz, R., and Vollmer, B. (2012). Long-term outcome in preterm children with human cytomegalovirus infection transmitted via breast milk. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 101, e167–e172.
 24. Gunkel, J., de Vries, L.S., Jongmans, M., Koopman-Esseboom, C., van Haastert, I.C., Eijssermans, M.C., van Stam, C., van Zanten, B.G., Wolfs, T.F., and Nijman, J. (2018). Outcome of Preterm Infants With Postnatal Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* 141, e20170635.
 25. Nijman, J., Van Zanten, B.G., De Waard, A.K.M., Koopman-Esseboom, C., De Vries, L.S., and Verboon-Maciolek, M.A. (2012). Hearing in preterm infants with postnatally acquired cytomegalovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31,

1082–1084.

26. Goelz, R., Meisner, C., Bevot, A., Hamprecht, K., Kraegelo-Mann, I., and Poets, C.F. (2013). Long-term cognitive and neurological outcome of preterm infants with postnatally acquired CMV infection through breast milk. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 98, F430-3.
27. Brecht, K.F., Goelz, R., Bevot, A., Krägeloh-Mann, I., Wilke, M., and Lidzba, K. (2015). Postnatal human cytomegalovirus infection in preterm infants has long-term neuropsychological sequelae. *J. Pediatr.* 166, 834-839.e1.
28. American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. e827-41 p.
29. Friis, H., and Andersen, H.K. (1982). Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at -20 degrees C and pasteurisation. *Br. Med. J.* 285, 1604–1605.
30. Hamprecht, K., Maschmann, J., Müller, D., Dietz, K., Besenthal, I., Goelz, R., Middeldorp, J.M., Speer, C.P., and Jahn, G. (2004). Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr. Res.* 56, 529–535.
31. Lloyd, M.L., Hod, N., Jayaraman, J., Marchant, E.A., Christen, L., Chiang, P., Hartmann, P., Shellam, G.R., and Simmer, K. (2016). Inactivation of cytomegalovirus in breast milk using ultraviolet-C irradiation: Opportunities for a new treatment option in breast milk banking. *PLoS One* 11.
32. Bapistella, S., Hamprecht, K., Thomas, W., Speer, C.P., Dietz, K., Maschmann, J., Poets, C.F., and Goelz, R. (2018). Short-term Pasteurization of Breast Milk to Prevent Postnatal Cytomegalovirus Transmission in Very Preterm Infants. *Clin. Infect. Dis.* 356, 421–435.